LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE ED ISTOLOGIA DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA
(diretto dal Prof. C. GOLGI)

CORRADO DA FANO
STUDENTE

SU ALCUNE MODIFICAZIONI

ai metodi per lo studio della nevroglia

Dal Bollettino della Società Medico-Chirurgica di Pavia
Comunic. letta nella seduta del 6 Maggio 1905

PAVIA
TIPOGRAFIA E LEGATORIA COOPERATIVA
1905

LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE ED ISTOLOGIA DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA
(diretto dal Prof. C. GOLGI)

CORRADO DA FANO
STUDENTE

SU ALCUNE MODIFICAZIONI
ai metodi per lo studio della nevroglia

Dal Bollettino della Società Medico-Chirurgica di Pavia
Comunic. letta nella seduta del 6 Maggio 1905

PAVIA
TIPOGRAFIA E LEGATORIA COOPERATIVA
1905

LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE ED ISTOLOGIA DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA
(Diretto dal Prof. C. GOLGI)

CORRADO DA FANO
STUDENTE

SU ALCUNE MODIFICAZIONI AI METODI PER LO STUDIO DELLA NEVROGLIA.

Nel corso di alcune mie ricerche sulla fine struttura della nevroglia trovai assai utile introdurre alcune modificazioni ai metodi attualmente in uso per lo studio di tale tessuto. Riserbandomi di esporre dettagliatamente in altro lavoro i risultati delle mie osservazioni, mi limiterò a dire per ora, in che consistano tali modificazioni nell'augurio che anche altri possa vantaggiosamente servirsene.

Non si tratta, a dire il vero, che di particolari fissazioni suggeritemi da due recenti pubblicazioni del Donaggio e del Cajal.

Il lavoro del Donaggio riguarda l'azione della piridina sul tessuto nervoso.

La piridina fu introdotta nella tecnica dal De Souza [1]) il quale trovò che non solo è un buon fissatore, ma che impartisce inoltre ai tessuti una particolare elettività per certi colori, funzionando in tal caso anche da mordente.

Più tardi il Goodall [2]) se ne servì per indurire sezioni di tessuto nervoso fatte a fresco.

[1]) De Souza — Comptes. Rend. hebd. Soc. de Biol. 8° Ser. IV., n. 35, p. 622.

[2]) Goodall — Brit. med. Journal (citato dall'Encykl. f. mikrosk. techn).

Andriezen [1]) l'adoperò, aggiunta al xilolo in parti uguali per rischiarare le sezioni fatte col metodo di Golgi.

Dopo questi autori la piridina, per quanto io sappia, non venne più usata nella tecnica, almeno per ricerche sul sistema nervoso, e cadde quasi in dimenticanza fino a che il Donaggio [2]) se ne servì per mettere in evidenza il fino reticolo da lui descritto nelle cellule nervose. " La piridina, dice il Donaggio, ha azione solvente su varie parti del tessuto nervoso mentre allo stesso tempo è un fissante perfetto ".

Volli provare se la piridina non potesse servire anche per lo studio della nevroglia: fissati e induriti in piridina alcuni pezzetti di midollo spinale di bue, ne feci sezioni che colorai coll'ematossilina fonsfotunstica di Mallory. Il risultato corrispose alle mie speranze; i protoplasmi delle cellule di nevroglia, abbastanza ben conservati, erano colorati debolmente in rosa come il connettivo, i cilindrassi e le cellule nervose; le fibre di nevroglia erano tinte elettivamente in azzurro. La fissazione in piridina non era tuttavia esente da difetti; questo liquido, infatti, impartiva ai pezzi una speciale durezza e fragilità per cui, il maggior numero delle volte, le sezioni si screpolavano in modo tale da non poter più servire per accurate osservazioni.

Allo scopo di eliminare questi inconvenienti pensai di servirmi invece della piridina pura di una soluzione acquosa di piridina, oppure del nitrato di piridina.

I migliori risultati li ottenni con questo secondo liquido, sia perchè i pezzi riescono molto meno duri e friabili di quelli fissati in piridina pura, sia perchè la colora-

[1]) Andriezen — Int. Mon. Anat. Phys. Bd. 104. 1893 (citato dalla En. f. m. tech).

[2]) Donaggio — Annali di Nevrologia, anno XXII Fasc. 1-2. 1904.

zione della nevroglia, coll'ematossilina di Mallory è più facile ed evidente.

Non contento dei risultati ottenuti, desideroso di avere fissazioni ancora migliori del protoplasma delle cellule di nevroglia, mi parve utile cercare se la piridina o il suo nitrato non potessero essere mescolate ad una soluzione di acido osmico, uno dei migliori fissatori del protoplasma, che la tecnica istologica metta a nostra disposizione. Le mie ricerche ebbero questa volta esito soddisfacente: trovai infatti: 1°) che il nitrato di piridina è suscettibile di essere addizionato in determinate proporzioni ad una soluzione osmica all'uno $^0/_0$; 2°) che questa miscela sebbene abbia uno scarso potere di penetrazione fissa i vari elementi assai bene; 3°) che le sezioni di pezzi fissati in tale miscela, opportunamente imbiancate e trattate con modalità tecniche che verrò più oltre accennando, forniscono bellissime immagini di nevroglia quando vengano colorate o con l'ematossilina ferrica o con quello dei metodi di Benda, che si basa sull' azione combinata del solfoalizarinato di soda e del bleu di toluidina.

Alquanto tempo prima che uscisse la pubblicazione del Donaggio, aveva Cajal [1]) esposto il suo metodo per la colorazione delle neuro-fibrille, fissando a questo scopo i pezzi direttamente in nitrato d'argento.

Non appena mi fu noto il metodo di Cajal feci subito alcuni preparati allo scopo di verificare, se con questo metodo riuscisse possibile anche una colorazione elettiva delle fibrille di nevroglia ed eventualmente uno studio dei rapporti fra fibrille e protoplasmi cellulari. Debbo dir subito che il metodo di Cajal si dimostrò completamente inadatto a questo scopo. Con tal metodo le fibrille di nevroglia non si colorano mai, però mi venne fatto d' osservare: Che

[1]) Trab. del. Lab. de Invest. biol. I Marzo 1904.

il citoplasma degli elementi di nevroglia riesce abbastanza ben conservato apparendo lievemente colorato in giallastro: che le sezioni di pezzi trattati col metodo di Cajal e sottoposte poi ai soliti processi d' imbiancamento acquistano un'elettività spiccata per alcuni colori quasi chè il nitrato d'argento funzioni da mordente.

Applicai allora a sezioni di pezzi di sistema nervoso fissati in nitrato d' argento, e opportunamente imbiancate, il metodo di Benda sopra detto ed ottenni dei discreti preparati di nevroglia, i quali, se non danno molto precise notizie sulla questione dei fini rapporti tra cellule e fibre, possono essere tuttavia utilizzati come preparati di controllo a quelli fatti cogli altri metodi di cui sopra ho parlato, e sono, d' altra parte, molto facili ad ottenersi.

Credo opportuno esporre ora un po' più dettagliatamente i metodi suaccennati.

Metodo primo: *Fissazione e inclusione.* — Piccoli pezzetti di tessuto nervoso vengono immersi per 24-48 ore in nitrato di piridina puro. (Sono solito preparare il nitrato di piridina volta per volta, seguendo l'indicazioni del Donaggio e precisamente: a 72 parti di piridina pura Merck, si aggiungono 28 parti di acido nitrico al 50 %: mescolare adagio e con precauzione i due liquidi, producendosi notevole sviluppo di calore e molti vapori).

I pezzi tolti dal liquido fissatore, lavati in acqua corrente per circa 6 ore, vengono passati nella serie degli alcool, rischiarati in olio di cedro e inclusi in parafina a 52°.

2°) *Colorazione.* — Le sezioni dello spessore di 8-10 micron vengono attaccate ai vetri porta oggetti con acqua ed albumina, e poi come di solito sparaffinate, passate per la serie discendente degli alcool e sciacquate in acqua; successivamente le sezioni vengono poste per quindici minuti

in una soluzione acquosa al 0.25 per cento di permanganato di potassa, sciacquate in acqua, e imbiancate in una soluzione acquosa d'acido ossalico all'uno per cento ; infine le sezioni vengono messe a colorare per 24-48 ore ed anche più in ematossilina fonsfotunstica di Mallory (per avere delle buone colorazioni è necessario servirsi di una buona ematossilina vecchia di almeno tre o quattro mesi od anche più); sciacquare in acqua distillata, passare per la serie ascendente degli acool, richiarare in xilolo, montare in balsamo.

Metodo secondo: *Fissazione inclusione.* — Piccoli pezzetti di sistema nervoso vengono immersi per 36-48-72 ore nella miscela seguente : nitrato di piridina parti 3, soluzione di acido osmico all' uno per cento parti 1, avendo cura di cambiare il liquido almeno una volta ; lavare in acqua corrente per 6-12 ore, indurire nella serie degli alcool, includere in paraffina come sopra.

Giova avvertire che il liquido penetra molto difficilmente, che i pezzi devono essere quindi piuttosto piccoli e si deve aver cura che le prime sezioni non vadano perse.

2°) *Colorazione.* — Le sezioni dello spessore di 8-10 micron vengono attaccate ai vetri porta oggetti con acqua ed albumina e poi sparaffinate come di solito, portate attraverso gli alcool fino all' acqua e imbiancate col solito metodo del permanganato di potassa e dell' acido ossalico. Le sezioni così trattate possono essere colorate, sia colle ematossilina ferrica secondo Heideneim sia secondo il primo metodo di Benda applicando alle sezioni tutti i mordenti che questo autore applica ai pezzi.

Siccome Benda ha successivamente alquanto modificato il suo primitivo procedimento così credo opportuno ripetere in succinto a quali modalità sono solito attenermi.

a) Applicazione dei mordenti.

1°) Immergere le sezioni per 24 ore nel mordente per la nevroglia di Weigert, tenendo il recipiente in cui stanno le sezioni nel termostato a 36°.

2°) Sciacquare in acqua; immergere le sezioni per 24 ore in acido cromico al mezzo per cento tenendo il recipiente alla temperatura della stanza.

3°) Sciacquare in acqua; immergere le sezioni per 24 ore in allume di ferro ammoniacale al 2 %, tenendo il recipiente alla temperatura della stanza.

b) Colorazione.

1°) Colorare per 24 ore in una soluzione acquosa di solfoalizarinato di soda color ambra gialla. (La soluzione si ottiene aggiungendo ad una vaschetta d'acqua distillata alcune goccie d' una soluzione alcoolica in alcool a 70 di solfoalizarinato di soda Grübler).

2°) Sciacquare in acqua; colorare per 15 minuti primi in una soluzione di bleu di toluidina al 1 ‰ (riscaldare prima, colorare poi, mentre si raffredda).

3°) Immergere in acqua acidulata con acido acetico all' uno per cento, disidratare in alcool assoluto, differenziare in creosoto controllando al microscopio; sciacquare in xilolo cambiato più volte, montare in balsamo.

Metodo terzo: *Fissazione e inclusione.* — Piccoli pezzi di sistema nervoso vengono lasciati in nitrato d' argento al 3 % per 4-5 giorni in un termostato a 36-37°. Dopo rapida lavatura in acqua, i pezzi vengono passati per gli alcool e inclusi come di solito.

Colorazione. — Le sezioni attaccate ai vetri portaoggetti con acqua albuminata, sparaffinate in xilolo, portate fino all'acqua attraverso la serie degli alcool, vengono imbiancate come di solito, e colorate secondo il procedimento di Benda come nel metodo secondo.